

# Best Available Copy

## Separation materials.

**Publication number:** DE3811042

**Publication date:** 1989-10-19

**Inventor:** MUELLER WERNER PROF DR  
(DE)

**Applicant:** MERCK PATENT GMBH (DE)

**Classification:**

**- international:** *B01J20/285; B01D15/08;*

*B01J20/32; B01J39/16;*

*B01J39/20; B01J39/26;*

*B01J41/08; B01J41/14;*

*B01J41/20; G01N30/88;*

*B01J20/281; B01D15/08;*

*B01J20/30; B01J39/00;*

*B01J39/26; B01J41/00;*

*B01J41/20; G01N30/00; (IPC1-7):*

*B01J39/06; B01J39/20; B01J41/06;*

*B01J41/14; C07H21/00; C07K3/22;*

*C08F291/08; C08J5/20; C12N7/00;*

*C12N9/00*


**- european:** *B01D15/08; B01J20/32;*


*B01J39/20; B01J41/14*


**Application number:** DE19883811042 19880331


**Priority number(s):** DE19883811042 19880331


**Also published as:**

 EP0337144 (A1)

 JP1310744 (A)

 DD283568 (A5)

 EP0337144 (B1)

 CS277592 (B6)

more >>

**Report a data error here**

Abstract not available for DE3811042

Abstract of corresponding document: **EP0337144**

The invention relates to separation materials based on carriers containing hydroxyl groups, the surfaces of which are coated with covalently bound polymers, the polymers having identical or different recurring units of the formula I in which R<1>, R', R'', Y and n are as defined in Claim 1, and to the use of these materials for the fractionation of biopolymers.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 3811042 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 38 11 042.3  
㉑ Anmeldetag: 31. 3. 88  
㉒ Offenlegungstag: 19. 10. 89

㉓ Int. Cl. 4:  
**B01J 41/14**

B 01 J 39/20  
B 01 J 41/08  
B 01 J 39/06  
C 08 J 5/20  
C 08 F 291/08  
C 07 K 3/22  
C 07 H 21/00  
C 12 N 9/00  
C 12 N 7/00  
// C07K 1/14,  
C08F 251/00,261/04,  
265/04,292/00,8/14,  
C12N 1/00,5/00

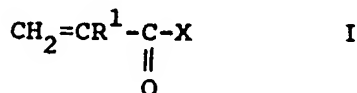
**DE 3811042 A1**

㉔ Anmelder:  
Merck Patent GmbH, 6100 Darmstadt, DE

㉕ Erfinder:  
Müller, Werner, Prof. Dr., 6148 Heppenheim, DE

㉖ Ionenaustauscher

Die Erfindung betrifft Ionenaustauscher auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberflächen mit kovalent gebundenen Polymeren beschichtet sind, wobei den Polymeren Monomere der Formel I

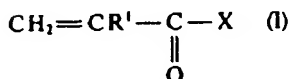


worin R<sup>1</sup> und X die in Anspruch 1 gegebene Bedeutung haben, zugrunde liegen, sowie die Verwendung dieser Materialien zur Fraktionierung von Biopolymeren.

**DE 3811042 A1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Ionenaustauscher auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberflächen mit kovalent gebundenen Polymeren beschichtet sind, wobei den Polymeren Monomere der Formel I



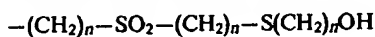
worin

$\text{R}^1$  H oder  $\text{CH}_3$ ,

$\text{X}$   $-\text{OH}$  oder  $-\text{NR}^2\text{R}^3$ ,

$\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  jeweils

eine Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, wobei diese Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können durch Alkoxy-, Cyano-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-, Sulfonsäure-, Acetoxy- oder Acetamino-Reste, einen cyclischen oder bicyclischen Rest mit 5–10 C-Atomen, worin eine oder mehrere  $\text{CH}$ - oder  $\text{CH}_2$ -Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, oder ein Sulfonsulfid der Struktur



mit  $n = 2-6$  bedeuten und einer der Reste  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  auch H bedeuten kann, wobei  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  so aufeinander abgestimmt sind, daß entweder beide Reste sauer oder basisch oder einer der beiden Reste neutral ist, zugrunde liegen, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Die erfindungsgemäßen Ionenaustauscher können zur Trennung von Makromolekülen, insbesondere zur Fraktionierung von Biopolymeren, eingesetzt werden.

Die Auftrennung und Reinigung biologischer Makromoleküle, wie z. B. Nucleinsäuren, Proteine, Enzyme, subzelluläre Einheiten, Peptide, monoklonale Antikörper oder ganze Zellen, hat im Hinblick auf die Gentechnologie und Biotechnologie große Bedeutung erlangt.

In der Literatur sind einige Trennmethode für Biopolymere beschrieben.

Es ist z. B. bekannt, daß sich Nucleinsäure- und Proteingemische in wäßrigem Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystem im Gegenstromverteilungsverfahren trennen lassen (P. A. Albertson [1971], 2nd Ed., Almqvist & Wisell, Stockholm). Als Weiterentwicklung werden in den EP 01 54 246 Phasenträger für die Verteilungschromatographie von Biopolymeren in einem Zweiphasensystem beschrieben. Diese Phasenträger bestehen aus nichtadsorptiven, in dem Phasensystem unlöslichen Grundträgerteilchen, deren Oberfläche mit einem fest anhaftenden Material (beispielsweise chemisch gebundenem Polyacrylamid) mit Affinität für eine der Phasen des Phasensystems beschichtet ist.

Bekannt ist auch der Einsatz von Ionenaustauschern zur Fraktionierung von biologischen Makromolekülen. Die herkömmlichen Materialien bestehen aus Polymeren wie z. B. Polymethacrylate, Polystyrole, Agarose, vernetztes Dextran oder Kieselgelen, die entsprechende funktionelle Gruppen tragen.

Das Auflösungsvermögen und die Bindungskapazität solcher Materialien sind jedoch häufig sehr unbefriedigend. Ferner werden die zu trennenden Biomoleküle oftmals denaturiert oder nicht mehr vollständig eluiert.

Die Zielsetzung in der vorliegenden Erfindung besteht darin, universell einsetzbare Ionenaustauscher für die Fraktionierung von Biopolymeren zu entwickeln, die frei von den genannten Nachteilen sind, d. h. die bei hoher Kapazität die zu trennenden Moleküle voll reversibel ohne Denaturierung zu binden vermögen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Ionenaustauscher die oben genannten Voraussetzungen erfüllen und für die Fraktionierung von Makromolekülen, insbesondere von Biopolymeren, geeignet sind.

Gegenstand der Erfindung sind somit Ionenaustauscher auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberflächen mit kovalent gebundenen Polymeren beschichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß den Polymeren Monomere der Formel I zugrunde liegen.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ionenaustauschern auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberflächen mit kovalent gebundenen Polymeren beschichtet sind, durch Pfropfpolymerisation in Gegenwart von  $\text{Ce}(\text{IV})$ -Ionen, bei welchem die hydroxylgruppenhaltigen Trägerteilchen in einer Lösung der Monomere der Formel I suspendiert und polymerisiert werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieser Ionenaustauscher zur Fraktionierung von Biopolymeren.

Die Struktur der erfindungsgemäßen Ionenaustauscher ist derjenigen der Phasenträger in EP 01 54 246 ähnlich. Im Gegensatz zu den dort beschriebenen Materialien weisen bei den erfindungsgemäßen Verbindungen die Polymeren an der Oberfläche der Trägerteilchen jedoch andere Strukturen und Eigenschaften auf. Die in der EP 01 54 246 beschriebenen Materialien werden in erster Linie als Phasenträger für die Verteilungschromatographie in Zweiphasensystemen eingesetzt und enthalten selbst keine chromatographisch aktiven Gruppen. Im Gegensatz dazu sind die erfindungsgemäßen Materialien selbst chromatographisch aktiv und können als Ionenaustauscher sowie als Träger für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Ionenaustauscher bestehen aus Trägerteilchen mit Hydroxylgruppen, auf die über die

$\alpha$ -C-Atome der Hydroxylgruppen ein polymeres Material, ausgehend von den Monomeren der Formel I, aufgepfropft ist.

Als Trägerteilchen kommen alle allgemein bekannten porösen und unporösen Chromatographieträger, die primäre oder sekundäre, aliphatische Hydroxylfunktionen an der Oberfläche aufweisen, in Frage.

Bevorzugt sind dabei beispielsweise hydrophile Polymere auf Acrylat- und Methacrylatbasis, Polymere auf Polyvinylalkohol-Basis, diolsubstituierte Kieselgele, Polysaccharide auf Agarose-Basis, Cellulose, Cellulosederivate oder Polymere auf Dextran-Basis. Es können aber selbstverständlich auch andere Polymere oder Copolymere auf der Grundlage von Monomeren wie Vinylverbindungen, Acrylamid, (Meth)Acrylsäureestern oder (Meth)Acrylnitril in hydroxylierter Form eingesetzt werden.

Das polymere Material, das über die  $\alpha$ -C-Atome der Hydroxylgruppen an die Trägerteilchen gebunden ist, basiert auf den Monomeren der Formel I. Diese Monomeren sind (Meth)-Acrylamid-Derivate ( $X = -NR^2R^3$ ) oder (Meth)Acrylsäure ( $X = OH$ ).

Alle diese Monomere stellen in wäßriger Lösung radikalisch polymerisierbare Substanzen mit reversibel bindenden Gruppen dar, die neutral, sauer oder basisch sein können.

In Formel I bedeutet  $R^1$  vorzugsweise H, d. h. die Acrylsäurederivate sind bevorzugt.

X bedeutet  $-OH$  oder  $-NR^2R^3$ , vorzugsweise  $-NR^2R^3$ .

Bevorzugt sind Monomere der Formel I, in denen X  $-NR^2R^3$  bedeutet und einer der Reste  $R^2$  und  $R^3$  H ist.

Die Reste  $R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten bevorzugt eine Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe, wobei die Alkyl- und/oder die Phenylgruppe ein- oder mehrfach, vorzugsweise ein- oder zweifach, insbesondere bevorzugt einfach, substituiert sein kann durch einen Alkoxy-, Cyano-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-, Sulfonsäure-, Acetoxy- oder Acetamino-Rest.

Die Reste  $R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten bevorzugt Alkyl, Alkoxyalkyl, Cyanoalkyl, Aminoalkyl, Mono- oder Dialkylaminoalkyl, Trialkylammoniumalkyl, Carboxyalkyl oder Sulfonsäurealkyl mit bis zu 10 C-Atomen, bevorzugt bis zu 6 C-Atomen, insbesondere bevorzugt bis zu 4 C-Atomen in der Alkylgruppe, die linear oder verzweigt sein kann.  $R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten demnach bevorzugt Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Methoxymethyl, Ethoxymethyl, 2-Methoxyethyl, 2-, 3- oder 4-Oxapentyl, 2-, 3-, 4- oder 5-Oxahexyl, 2-, 3-, 4-, 5- oder 6-Oxaheptyl, Isopropyl, 2-Butyl, Isobutyl, 2-Methylbutyl, Isopentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 2-Oxa-3-methylbutyl, 3-Oxa-4-methylbutyl, 2-Methyl-3-oxapentyl, 2-Methyl-3-oxahexyl, ferner auch Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl.

Ferner bevorzugt sind auch Alkylgruppen, die durch eine Cyano-, Carboxy- oder Sulfonsäuregruppe substituiert vorliegen. Demnach bedeuten  $R^2$  und/oder  $R^3$  bevorzugt Cyanomethyl, Cyanoethyl, Cyanopropyl, Cyanobutyl, Cyanopentyl, Cyanoheptyl, 2-Cyanopropyl, 2-Cyanobutyl, Carboxymethyl, Carboxylethyl, Carboxylpropyl, Carboxylisopropyl, Carboxylbutyl, Carboxylpentyl, Carboxylhexyl, Carboxyl-2-methylpropyl, Carboxyl-2-methylbutyl, Sulfonsäuremethyl, Sulfonsäureethyl, Sulfonsäurepropyl, Sulfonsäurebutyl, Sulfonsäurepentyl, Sulfonsäurehexyl, Sulfonsäure-2-methylpropyl, Sulfonsäure-2-methylbutyl, Sulfonsäure-3-methylbutyl, Sulfonsäure-2-methylpentyl, Sulfonsäure-3-methylhexyl oder Sulfonsäure-2-ethylpentyl.

Ferner sind die Alkylgruppen bevorzugt einfach substituiert durch eine Amino-, Mono- oder Dialkylamino- oder Trialkylammoniumgruppe. Die Alkylgruppen können dabei gleich oder verschieden sein und bis zu 10, vorzugsweise bis zu 6 C-Atomen, insbesondere bevorzugt bis zu 4 C-Atomen, besitzen und bedeuten demnach vorzugsweise Dimethylaminoethyl, Diethylaminoethyl, Methylaminoethyl, Methylaminopropyl, Dimethylaminopropyl, Ethylaminoethyl, Propylaminoethyl, Propylaminopropyl, Dipropylaminoethyl, Dipropylaminobutyl, Diethylaminoethyl, Trimethylammoniummethyl, Trimethylammoniumpropyl, Trimethylammoniumbutyl, Triethylammoniummethyl, Triethylammoniumpropyl, Triethylammoniumethyl, Aminoethyl, Aminopropyl, Aminobutyl oder Aminopentyl. Alle diese Alkyl- und substituierte Alkylgruppen sind ebenfalls bevorzugt als Substituenten an der Phenylgruppe.

Bevorzugt für  $R^2$  und/oder  $R^3$  ist auch ein Sulfonsulfid der Struktur



mit  $n = 2, 3, 4, 5$  oder 6, vorzugsweise 2, 3 oder 4.

Vorzugsweise hat  $R^2$  und/oder  $R^3$  auch die Bedeutung einer Phenylgruppe, die vorzugsweise einfach substituiert ist durch Cyano, Cyanoalkyl, Amino, Aminoalkyl, Mono- oder Dialkylamino, Alkyl, Alkoxy, Alkoxyalkyl, Mono- oder Dialkylaminoalkyl, Trialkylammonium- oder Trialkylammoniumalkyl, Carboxy, Carboxyalkyl, Sulfonsäure oder Sulfonsäurealkyl. Die bevorzugten Bedeutungen dieser Substituenten entsprechen den vorstehend angegebenen bevorzugten Alkylgruppen und substituierten Alkylgruppen. Der Substituent an der Phenylgruppe sitzt vorzugsweise in p-Stellung.

p-Acetoxyphenyl, p-Aminophenyl oder p-Acetaminophenyl sind ebenfalls bevorzugte Bedeutungen für  $R^2$  und/oder  $R^3$ .

Bevorzugt für  $R^2$  und/oder  $R^3$  ist ferner eine Alkylphenyl- oder Phenylalkylgruppe, wobei ebenfalls die angegebenen bevorzugten Bedeutungen für die Alkyl-, substituierten Alkyl- oder substituierten Phenylgruppen gelten sollen.

Demnach gelten folgende substituierte Phenylgruppen beispielsweise als besonders bevorzugt: 4-Cyanophenyl, 4-Alkylphenyl, 4-(N,N-Dimethylamino)-phenyl, 4-(N,N-Dialkylaminoethyl)-phenyl, 4-Ethoxyphenyl, 4-Ethoxyethylphenyl, 4-Trialkylammoniumphenyl, 4-Carboxylphenyl, 4-Sulfonsäurephenyl, Phenylethyl, 4-(N-Ethylamino)phenylpropyl oder 4-Cyanophenyl-ethyl.

Des weiteren sind Monomere der Formel I bevorzugt, in denen  $R^2$  und/oder  $R^3$  einen cyclischen oder bicyclischen Rest, der aromatisch oder gesättigt sein kann, mit 5–10 C-Atomen, worin ein- oder mehrere CH- oder CH<sub>2</sub>-Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, bedeuten.

$R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten demnach bevorzugt auch einen Pyridinrest, Imidazolylrest, Indolylrest, ferner bevorzugt einen Pyrrol-, Pyrimidin-, Pyrazin-, Chinolin- oder Isochinolinrest.

$R^2$  und/oder  $R^3$  können beispielsweise auch einen Thiazol-, Thiadiazol-, Morpholin-, Triazin-, Piperazin-, Benzothiazol-, Purin-, Pyrazol-, Triazol-, Pyrolidin- oder Isoxazol-Rest bedeuten.

Insbesondere bevorzugt sind dabei die aromatischen, heterocyclischen Reste.

Die Reste  $R^2$  und  $R^3$  müssen, um zu geeigneten Austauschern zu gelangen, so aufeinander abgestimmt werden, daß entweder beide Reste eine saure oder basische Gruppe enthalten oder aber einer der Reste neutral ist. Dem Fachmann bereitet es keine Schwierigkeit, die Gruppen entsprechend zuzuordnen und somit geeignete Reste für  $R^2$  und  $R^3$  zusammenzustellen, je nach Funktion und Aufgabe des gewünschten Ionenaustauschers.

Vorzugsweise ist einer der beiden Reste  $R^2$  und  $R^3$  ein neutraler Rest.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Materialien werden die hydroxylgruppenhaltigen Trägerteilchen in einer Lösung von Monomeren suspendiert, vorzugsweise in einer wäßrigen Lösung. Das Aufpfropfen des polymeren Materials wird im Zuge einer üblichen Redoxpolymerisation unter Sauerstoffausschluß bewirkt. Als Polymerisations-Katalysator werden  $Ce(IV)$ -Ionen eingesetzt, da dieser Katalysator an der Oberfläche der Trägerteilchen Radialstellen bildet, von welchen die Pfropfpolymerisation der Monomere gestartet wird. Die Länge und Anzahl der entstehenden Ketten können vom Fachmann durch Einstellen der  $Ce(IV)$ -Salz- und der Monomerkonzentration nach Wunsch gesteuert werden.

Bezüglich Einzelheiten dieses an sich bekannten Verfahrens wird auf E. Mino und S. Kaizerman in J. of Polymer Science, Vol. XXXI, Nr. 122 (1958), 242–243 verwiesen.

Zur Herstellung von Ionenaustauschern, die ein Copolymer an der Oberfläche gebunden haben, werden einfach die entsprechenden, verschiedenen Monomeren der Formel I in der Lösung suspendiert.

Für eine Copolymerisation müssen dabei, um erfindungsgemäße Austauscher zu erhalten, die Monomeren der Formel I so gewählt werden, daß beide Monomere entweder basische oder saure Gruppen enthalten oder ein Monomeres neutral ist.

Ansonsten gelten für die Auswahl der Monomeren, die für eine Copolymerisation geeignet sind, die allgemeinen Regeln und Bedingungen, die der Fachmann aus dem Stand der Technik entnehmen kann.

Die Vielzahl der einsetzbaren Monomeren der Formel I führen zu einer großen Palette von schwach basischen, schwach sauren bis stark sauren oder basischen Austauschern sowie Trägern für die Affinitätschromatographie.

Die Austauscher sind insbesondere für die Fraktionierung von Biopolymeren, wie z. B. Peptide, Proteine und Nucleinsäuren geeignet.

Weiter können die erfindungsgemäßen Ionenaustauscher zur Trennung und Reinigung von Viren, Zellorganellen, prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen sowie Proteinkomplexen eingesetzt werden.

Für jedes Trennproblem kann bei der großen Anzahl von Monomeren der optimale Austauscher hergestellt werden, so daß Affinitätseffekte mit ionischen Bindungen kombiniert werden können.

Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Austauscher mit sehr viel höherer Bindungskapazität herstellbar sind als die üblichen Ionenaustauscher.

Außerdem werden auch bei diesen Materialien beispielsweise Desoxyribonucleinsäuren voll reversibel gebunden und Restriktionsfragmente werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

Ein großer Vorteil dieser neuen Austauscher liegt darin, daß durch die Beweglichkeit der aufgepfropften Kettenpolymeren jedes geladene Makromolekül entsprechende Gegengruppen im optimalen Abstand zur Matrix findet.

Außerdem entstehen keine strukturellen Änderungen des gebundenen Makromoleküls, da sich der Austauscher mit seinen z. B. basischen Austauschergruppen an die Anordnung der sauren Gruppen eines Makromoleküls anpaßt und nicht umgekehrt.

Mit den erfindungsgemäßen Materialien steht somit eine Vielzahl von verschiedenartigsten Austauschern, die bezüglich Struktur und Funktionsweise neu sind, zur Trennung von Makromolekülen, insbesondere Biopolymeren zur Verfügung.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

In den Beispielen wurden folgende hydroxylgruppenhaltige Träger als Ausgangsmaterialien eingesetzt: Fractogel® TSK HW 65 (S) – 5S(S) – poröses Mischpolymeres auf Vinylbasis, 1 m Äq OH/g. (Fa. E. Merck) LiChrospher®-Diol: Diolsubstituiertes Kieselgel (Fa. E. Merck).

#### Beispiel 1

##### Herstellung eines schwach sauren Kationenaustauschers

50 ml abgesaugtes Fractogel HW 65(s) werden in einer Lösung von 19 g Acrylsäure in 150 ml Wasser suspendiert, mit Argon durchspült und unter Sauerstoffausschluß bei 25°C mit 15 ml einer 0,4-M-Lösung von Ammonium- $Ce(IV)$ -nitrat in 0,1 M  $HNO_3$  versetzt und 3 Std. bei der gleichen Temperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wird abgesaugt, mit Wasser, danach mit 500 ml Natriumsulfit in 10%iger Essigsäure, anschließend mit 500 ml 0,2-M-NaOAc-Lösung und schließlich wieder mit Wasser gewaschen.

Das Produkt enthält 0,8 mVal saure Gruppen pro ml und bindet 99 mg Lysozym pro ml gepackten Gels aus 20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0, welches in 0,5 Mol/l NaCl in Phosphat vollständig wieder abgegeben wird.

#### Beispiel 2

##### Herstellung eines schwach basischen Ionenaustauschers

## OS 38 11 042

100 ml sedimentiertes LiChrospher®-Diol (1000 Å Porenweite, 10 µm Partikelgröße) werden gründlich mit dest. Wasser, 0,2 M-NaOAc-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen und in einer Lösung von 104 g N,N-Dimethylaminoethyl-acrylamid (A) in 700 ml Wasser (mit HNO<sub>3</sub> auf pH 5,0 eingestellt) in einem 1000-ml-Reaktionsgefäß mit Thermostatenmantel suspendiert, auf 25°C temperiert und der Luftsauerstoff aus der Suspension durch Ar verdrängt. 100 ml einer 0,4-M-Cer-ammonium-nitrat-Lösung in 1 M HNO<sub>3</sub> werden unter Luftabschluß zugesetzt, und die Suspension wird bei ca. 200 UpM mit einem Flügelrührer 3 Stdn. gerührt. Die Reaktion wird durch Luftzutritt gestoppt, das Reaktionsprodukt abfiltriert, mit 500 ml Wasser gewaschen, mit 500 ml 0,2-M-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> in 10% AcOH danach mit 500 ml 0,2-M-NaOAc gespült und mit Wasser neutral gewaschen.

N-Gehalt: 1,1%;  
Bindungskapazität für Rinder-Serum-Albumin: 60 mg/ml Gel (0,05 M Tris-Puffer, pH 8,3).

### Beispiel 3

Herstellung eines basischen Austauschers 15

Pfropfpolymerisation auf LiChrospher®-Diol (100 Å Porenweite, 10 µm Partikelgröße)

Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 2; anstelle von (A) werden jedoch 123 g N,N-Diethylaminoethyl-acrylamid (B) eingesetzt. 20

N-Gehalt: 0,5%;  
Bindungskapazität für Rinder-Serum-Albumin: 45 mg/ml (0,05 M Tris-Puffer, pH 8,3).

### Beispiel 4 25

Herstellung eines stark basischen Anionenaustauschers

Ausgangsmaterial: LiChrospher®-Diol (1000 Å Porenweite, 10 µm Partikelgröße)

Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 2; anstelle von (A) werden 113 g Trimethylammoniummethyl-acrylamid (C) eingesetzt. 30

N-Gehalt: 0,5%;  
Bindungskapazität für Rinder-Serum-Albumin: 76,3 mg/ml Gel (0,05 M Tris-Puffer, pH 8,3). 35

### Beispiel 5

Herstellung eines stark sauren Austauschers

Ausgangsmaterial: Li-Chrospher®-Diol (1000 Å Porenweite, 10 µm Partikelgröße)

Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 2; anstelle von (A) werden 150 g 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (D) eingesetzt. 45

N: 0,2%;  
S: 0,2%;  
Bindungskapazität für Lysozym: 36 mg/ml Gel (20 mM PO<sub>4</sub>, pH 7,0)

### Beispiel 6 50

Herstellung eines schwach basischen Austauschers

Ausgangsmaterial: Fractogel TSK HW 55(S)

Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 2; anstelle von LiChrospher®-Diol werden 100 ml Fractogel® eingesetzt und 60 g N,N-Dimethylaminoethyl-acrylamid (A). 55

N: 5,31%;  
Bindungskapazität für Rinder-Serum-Albumin: 57 mg/ml Gel (0,05 M Tris, pH 8,3). 60

### Beispiel 7

Herstellung eines basischen Austauschers

Ausgangsmaterial: Fractogel® TSK HW 65 (M)

Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 2; anstelle von (A) werden 123 g N,N-Diethylaminoethyl-acrylamid

eingesetzt.

N: 2,5%;  
Bindungskapazität für Rinder-Serum-Albumin: 79 mg/ml Gel (0,05 M Tris-Puffer, pH 8,3).

5

## Beispiel 8

### Herstellung eines stark basischen Anionenaustauschers

10 Ausgangsmaterial: Fractogel® TSK HW 65(M) 100 ml 113 g Trimethylammoniummethacrylamid

Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 2.

15 N: 3,80%;  
Bindungskapazität für Rinder-Serum-Albumin: 154 mg/ml Gel (0,05 M Tris-Puffer, pH 8,3).

## Beispiel 9

20 Analog Beispiel 2 stellt man aus 100 ml Fractogel® TSK HW 65(S) und 150 g 2-Acrylamido-2-methylpropan-sulfonsäure einen stark sauren Ionenaustauscher her.

25 N: 0,5%,  
S: 0,7%;  
Bindungskapazität für Lysozym: 51 mg/ml Gel (20 mM PO<sub>4</sub>, pH 7,0).

In den vorstehenden Beispielen bedeutet

30 Tris: Tris (hydroxymethyl)aminomethan.  
HCl und PO<sub>4</sub>: Natriumphosphatpuffer.

Die folgenden Beispiele betreffen Anwendungsbeispiele.

## Beispiel A

35 Fraktionierung von DNA-Restriktionsfragmenten

40 Der nach Beispiel 2 hergestellte basische Austauscher wird in einer Superformance®-Säule (50 × 10 mm, Hersteller: E. Merck) in 20 mM Tris-HCl, pH 6,5, gepackt, mit dem gleichen Puffer bei 2 ml/min equilibriert, mit 3 Absorptionseinheiten (260 nm) Restriktionsfragmenten aus pDSI-Plasmid mit den Längen 11, 18, 31, 45, 80, 85, 87, 222, 262, 267, 270, 314, 434, 458, 587 und 657 Basenpaaren beladen. Bei der nachfolgenden Elution mit einem NaCl-Gradienten (0–1 M NaCl) im Equilibrierungspuffer bei 1 ml/min resultierte eine sehr gute Trennung der einzelnen Restriktionsfragmente.

## Beispiel B

45

### Fraktionierung von Ziegen-Serum

50 Das in Beispiel 8 hergestellte Material wird in einer Superformance®-Säule (50 × 10 mm) gepackt, mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,3, equilibriert, mit 50 µl Serum in 250 µl Puffer beschickt und mit einem linearen Gradienten von 0–500 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im gleichen Puffer eluiert. Man erhält eine beachtenswerte Abtrennung der Globuline vom Albumin.

## Beispiel C

55

### Trennung von β-Lactoglobulin A und B

60 Das nach Beispiel 3 hergestellte Material wird in einer Superformance®-Säule (50 × 10 mm) gepackt, mit 20 mM Na-PO<sub>4</sub>, pH 6,8, equilibriert, mit 0,6 mg käuflichem Gemisch von β-Lactoglobulin A und B in 100 µl Puffer beschickt und mit einem 50-ml-Gradienten von 0–500 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (linear) im angegebenen Puffer eluiert. Man erhält eine sehr gute Trennung von β-Lactoglobulin A und β-Lactoglobulin B.

## Beispiel D

65

### Fraktionierung von Maus-Ascites-Flüssigkeit mit monoklonalem Antikörper

Das nach Beispiel 3 hergestellte Material wird in einer Superformance®-Säule (50 × 10 mm) gepackt, mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,3, equilibriert mit 1,5 ml Ascites-Flüssigkeit in 4,5 ml Puffer beschickt, und mit einem Gradienten (100 ml) von 0–250 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Startpuffer eluiert.

## Beispiel E

## Fraktionierung von Immunglobulin (IgG) aus Humanserum

1. Das in Beispiel 5 hergestellte Material wird in einer Superformance®-Säule (50 x 10 mm) gepackt, mit 10 mM NaOAc/HOAc, pH 5,0, equilibriert, mit 3,5 mg IgG beladen und mit einem NaCl-Gradienten (100 ml, 0—1 M) im gleichen Puffer eluiert. Man erhält eine relativ gute Fraktionierung
2. Fraktionierung analog zu 1. unter Verwendung des in Beispiel 9 hergestellten Materials.
3. Fraktionierung von IgG analog zu E 1. an herkömmlichen SP-Fractogel 650(s): Das erhaltene Elutionsprofil zeigt hierbei kaum eine Fraktionierung.

Man kann aus diesen Versuchen erkennen, daß bei Verwendung eines herkömmlichen Materials eine schlechtere Auftrennung erfolgt als bei Verwendung von erfindungsgemäßen Austauschern.

## Beispiel F

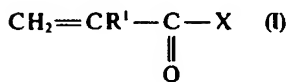
## Fraktionierung von Maus-Ascites-Flüssigkeit mit monoklonalem Antikörper

Der nach Beispiel 5 hergestellte, stark saure Austauscher wird in einer Superformance®-Säule (50 x 10 mm) gepackt, mit 10 mM NaOAc/AcOH, pH 5,0, equilibriert, mit 100 µl Ascites beladen und in einem Gradienten (50 ml von 0 nach 500 mM NaCl) eluiert. Man erhält eine gute Abtrennung der Immunglobuline mit dem monoklonalen Antikörper.

Aus den obigen Beispielen ist ersichtlich, daß mit den erfindungsgemäßen Ionenaustauschern sehr gute Trennergebnisse zu erzielen sind und diese Materialien vorteilhaft für die Trennung von Biopolymeren geeignet sind.

## Patentansprüche

1. Ionenaustauscher auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberfläche mit kovalent gebundenen Polymeren beschichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß den Polymeren Monomere der Formel I



worin

R<sup>1</sup> H oder CH<sub>3</sub>,

X —OH oder —NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>,

R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> jeweils

eine Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, wobei diese Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können durch Alkoxy-, Cyano-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-, Sulfonsäure-, Acetoxy- oder Acetamino-Reste, einen cyclischen oder bicyclischen Rest mit 5—10 C-Atomen, worin eine oder mehrere CH- oder CH<sub>2</sub>-Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, oder ein Sulfonsulfid der Struktur



mit n = 2—6 bedeuten und einer der Reste R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> auch H bedeuten kann, wobei R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> so aufeinander abgestimmt sind, daß entweder beide Reste sauer oder basisch oder einer der beiden Reste neutral ist, zugrunde liegen.

2. Ionenaustauscher nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß X in Formel I —OH bedeutet.

3. Ionenaustauscher nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß X in Formel I —NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> ist; worin R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> jeweils

Alkyl, Alkoxyalkyl, Cyanoalkyl, Aminoalkyl, Mono- oder Dialkylaminoalkyl, Trialkylammoniumalkyl, Carboxyalkyl, Sulfonsäurealkyl mit jeweils bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, unsubstituiertes oder durch einen oder mehrere Alkyl-, Alkoxy-, Alkoxyalkyl-, Cyano-, Cyanoalkyl-, Aminoalkyl-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Mono- oder Dialkylaminoalkyl-, Trialkylammonium-, Trialkylammoniumalkyl-, Carboxy-, Carboxyalkyl, Sulfonsäure-, Sulfonsäurealkyl-, Acetoxy- oder Acetamino-Gruppe(n) substituiertes Phenyl mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, einen cyclischen oder bicyclischen Rest mit 5—10 C-Atomen, worin eine oder mehrere CH- oder CH<sub>2</sub>-Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, oder ein Sulfonsulfid der Struktur

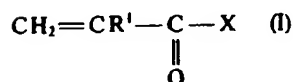




mit  $n = 2-6$  bedeuten und einer der Reste  $R^2$  und  $R^3$  auch H bedeuten kann, wobei  $R^2$  und  $R^3$  so aufeinander abgestimmt sind, daß entweder beide Reste sauer oder basisch oder einer der beiden Reste neutral ist.

4. Ionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer ein Copolymer, basierend auf Monomeren der Formel I, ist.

5. Verfahren zur Herstellung von Ionenaustauschern auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberflächen mit kovalent gebundenen polymeren beschichtet sind, durch Pfropfpolymerisation in Gegenwart von Cer(IV)-Ionen, dadurch gekennzeichnet, daß die hydroxylgruppenhaltigen Trägerteilchen in einer Lösung der Monomeren der Formel I



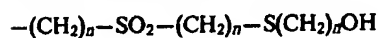
worin

$R^1$  H oder  $\text{CH}_3$ ,

$X$   $-\text{OH}$  oder  $-\text{NR}^2\text{R}^3$ ,

$R^2$  und  $R^3$  jeweils eine

Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, wobei diese Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können durch Alkoxy-, Cyano-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-, Sulfonsäure-, Acetoxy- oder Acetamino-Reste, einen cyclischen oder bicyclischen Rest mit 5-10 C-Atomen, worin eine oder mehrere  $\text{CH}_2$ -Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, oder ein Sulfonsulfid der Struktur



mit  $n = 2-6$  bedeuten und einer der Reste  $R^1$  und  $R^2$  auch H bedeuten kann, wobei  $R^2$  und  $R^3$  so aufeinander abgestimmt sind, daß entweder beide Reste sauer oder basisch oder einer der beiden Reste neutral ist, suspendiert und polymerisiert werden.

6. Verwendung der Ionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Fraktionierung von Biopolymeren.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**